

# РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ЛИЗОЦИМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И ЕГО СОДЕРЖАНИЕ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОТДЕЛЕНИИ РЕАНИМАЦИИ

*Земко В.Ю., Какойченкова А.К., Окулич В.К.*

УО «Витебский государственный медицинский университет»

**Актуальность.** Одним из факторов, определяющих устойчивость организма к микробным воздействиям, является лизоцим, содержащийся в слюне, слезах, желудочном соке, сыворотке крови и в других жидкостях и тканях [1]. Лизоцим продуцируют макрофаги и специальные эпителиальные клетки. Терапевтический эффект лизоцима связан с его антимикробным действием, зависящим от ферментативных свойств данного белка. Лизоцим расщепляет полностью или частично клеточные стенки многих видов микробов, состоящие из мукопептидов, глюкозаминопептидов и хитинов. В клинической лабораторной практике определение уровня лизоцима дает возможность оценить активность фагоцитарной системы и полезно в качестве мониторинга течения инфекционных и воспалительных заболеваний. [2]. Снижение лизоцима в сыворотке крови и особенно в слюне может служить показателем хронической инфекции в организме. Более значительное снижение содержания лизоцима в биологических жидкостях можно использовать в качестве дополнительного теста дифференциальной диагностики хронического и острого состояния. Низкое содержание лизоцима до лечения в слюне и сыворотке и повышение его после терапевтических мероприятий является показателем эффективности проведенного лечения.

**Цель:** разработать способ определения количества лизоцима в биологических средах и определить его роль в инфекционной патологии в отделении реанимации.

**Материал и методы.** С целью иллюстрации возможности использования предложенного нами метода определения количества лизоцима в сыворотке крови была взята группа из 45 пациентов с бактериальной инфекцией, находящихся на лечении в РАО УЗ «ВОКБ». Средний возраст исследуемой группы составил  $51,8 \pm 12,7$  лет. В качестве группы сравнения использовалась сыворотка крови 22 практически здоровых лиц.

**Результаты и обсуждение.** Нами разработан более простой и наименее затратный способ определения активности лизоцима, не требующий длительных временных затрат, обладающий четкими критериями оценки. Сущность предлагаемой нами методики заключается в предварительном выделении пептидогликана из клеточной стенки *M. lysodeikticus*, последующей его меткой Конго красным и возможностью длительного

хранения при температуре  $-25^{\circ}\text{C}$ . Реализация данной задачи достигается за счет того, что из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 предварительно получают субстрат пептидогликана по методике, предложенной Львовом В.Л., Пинегиным Б.В., Хаитовым Р.М. в нашей модификации. В качестве культуры использовали *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, т.к. он наиболее чувствителен к действию лизоцима. Модификация методики заключалась в том, что суспензию пептидогликана, полученную после диализа, разбивали ультразвуком (аппарат «Тонзиллор-М») в течение 60 мин. Полученную суспензию с целью очистки пептидогликана от частиц ДНК обрабатывали ферментом ДНКазой в концентрации 1,7 мг на 1 мл и метили 2%-ым раствором Конго красного в соотношении 20 мкл на 1 мл суспензии. Затем проводили инкубацию в течение 10 минут при температуре  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , центрифугировали 2 раза в течение 1 часа при 1,0 тыс. об/мин для удаления не связавшегося красителя. Оценку качества полученного субстрата проводили посредством конфокальной микроскопии.

Далее определяли активность лизоцима. В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 300 мкл 0,06 М фосфатного буферного раствора (ФБР) pH 6,0, 100 мкл субстрата и 100 мкл биологического объекта. Во второй ряд эппендорфов - 300 мкл ФБР, 100 мкл субстрата и 100 мкл сыворотки, которую предварительно нагревали в течение часа при температуре  $56^{\circ}\text{C}$  для инактивации комплемента. Контролем служили пробы, содержащие фосфатный буферный раствор pH 6,0 в количестве 300 мкл, 100 мкл 0,9% раствора NaCl и 100 мкл биологического объекта. Далее проводили инкубацию проб в термостате при  $t=37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч., затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 7 мин (10 тыс. об/мин; MICRO 120). Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета. При длине волны 492 нм определяли оптическую плотность в лунках. Промежуточный результат выражали в оптических единицах и рассчитывали как разность оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных. Для пересчета итогового результата активности лизоцима в мкг/мл была использована формула, полученная после проведения корреляционно-регрессионного анализа и построения подобранного калибровочного графика по разведенному, в котором отражена зависимость концентрации лизоцима от освобождения раствора Конго красного из субстрата.

Уравнение функции имело следующий вид:

$$X = 7318,72 * (E_{\text{опп}} - E_{\text{опк}})^{2,5783}$$

где X - активность лизоцима, в мкг/мл;

$E_{\text{опп}}$  - оптическая плотность пробы;

$E_{\text{опк}}$  - оптическая плотность контроля.

В результате исследования было установлено, что суммарное количество лизоцима и комплемента у пациентов с бактериальной инфекцией оказалось достоверно ниже (183,6; 141,2-298,7 мкг/мл), чем в

группе сравнения (445,6; 350,7-816,7 мкг/мл). После-инактивации комплемента как у пациентов с бактериальной инфекцией (116,0; 56,5-160,1 мкг/мл), так и в группе сравнения (246,7; 183,6-305,7 мкг/мл) происходит статистически значимое снижение количества лизоцима в сыворотке крови.

Получено уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение «Способ определения активности лизоцима в биологической среде» 19.12.2016 №а20160477.

**Выводы.** Разработан способ определения активности лизоцима в биологических жидкостях, включающий выделение пептидогликана из клеточной стенки *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 и подготовку реакционной смеси, состоящей из пептидогликана, меченого 2%-ым Конго красным, биологической жидкости, 0,06 М фосфатного буферного раствора рН 6,0. Установлен достоверный более низкий уровень лизоцима и комплемента в сыворотке крови у пациентов с бактериальной инфекцией, чем в группе сравнения. После инактивации комплемента в обеих группах происходит статистически значимое снижение лизоцима сыворотки крови. Значительная часть активности принадлежит лизоциму, так как разница между группой сравнения и пациентов с бактериальной инфекцией после инактивации комплемента сохраняется.

#### **Литература:**

1. Биохимия / И.П.Баскова [и др.]. – 2008. – Т. 73, вып. 3. – С. 388–394.
2. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – Медицина, 2005.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ДЕСКРИПТОРОВ, ОТРАЖАЮЩИХ ВЕЛИЧИНУ СВЯЗЫВАНИЯ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ**

**Егоров С.К., Лятос И.А.**

УО «Витебский государственный медицинский университет»

**Актуальность.** Эффективность антибактериальной терапии зависит от большого числа факторов. Даже если микроорганизм чувствителен к выбранному препарату, а параметры, на которые обращается основное внимание при выборе: метод введения антибиотика, дозировка и кратность применения соответствуют лучшим рекомендациям, остаётся ряд факторов способных значительно уменьшить эффективность терапии, вплоть до необходимости её замены. Среди них особое место занимает взаимодействие с белками плазмы крови [1].

Альбумин обладает уникальной способностью связывать и транспортировать значительное число лигандов различной химической структуры, таких как билирубин, жирные кислоты, а также лекарственные